

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-197796

(43)公開日 平成6年(1994)7月19日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/28		6807-4B		
G 0 1 N 21/76		7906-2 J		
33/531	B	8310-2 J		
33/535		8310-2 J		
33/78		7055-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数4(全 13 頁)

(21)出願番号	特願平5-191001	(71)出願人	590000846 イーストマン コダック・カンパニー アメリカ合衆国, ニューヨーク14650, ロ チェスター, ステイト ストリート343
(22)出願日	平成5年(1993)8月2日	(72)発明者	トーマス ロバート キッセル アメリカ合衆国, ニューヨーク 14612, ロチェスター, ウィローウッド ドライブ 200
(31)優先権主張番号	9 2 3 6 6 2	(74)代理人	弁理士 宇井 正一 (外4名)
(32)優先日	1992年8月3日		
(33)優先権主張国	米国(US)		

(54)【発明の名称】 カチオン界面活性剤もしくはポリマー及び4'-ヒドロキシアセトアニリドを含有する化学ルミネセンス組成物、試験キット並びに分析方法におけるそれらの用途

(57)【要約】

【目的】 化学ルミネセンス信号発生性組成物を提供する。

【構成】 分析方法において化学ルミネセンス信号を提供するのに有用な水性組成物は、特定量の低分子量カチオン界面活性剤もしくはカチオンポリマーの存在により安定化される。また組成物は、2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオン誘導体、例えば、ルミノール、及び4'-ヒドロキシアセトアニリドを含む。化学ルミネセンス信号は、ペルオキシダーゼ又はペルオキシダーゼ標識特異的バインディング種（例えば、抗体もしくはオリゴヌクレオチド）の存在下で組成物を用いて発生せしめられる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 7～9.5のpHを有し、そして

- a) 2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオン誘導体、
- b) 低分子量カチオン界面活性剤（その臨界ミセル濃度を越える0.05～0.25%で存在する）又は0.01～2%のカチオンポリマー、並びに
- c) 4'-ヒドロキシアセトアニリド、を含んで成る化学ルミネセンス信号を提供するための組成物。

【請求項2】 個別に包装された

- a) 2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオン誘導体、及び1つ以上の以下の試薬、
- b) 低分子量カチオン界面活性剤（その臨界ミセル濃度を越える0.05～0.25%で存在する）又は0.01～2%のカチオンポリマー、
- c) 4'-ヒドロキシアセトアニリド、並びに
- d) ベルオキシダーゼもしくはベルオキシダーゼ標識特異的バインディング種、を含んで成る診断試験キット。

【請求項3】 A. ベルオキシダーゼを、

2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオン誘導体、酸化体、

低分子量カチオン界面活性剤（その臨界ミセル濃度を越える0.05～0.25%で存在する）又は0.01～2%のカチオンポリマー、並びに4'-ヒドロキシアセトアニリドの存在下で反応せしめて化学ルミネセンス信号を生成する工程、そして

B. 得られた信号を検出する工程、を含んで成るベルオキシダーゼに応じて化学ルミネセンス信号を提供する方法。

【請求項4】 A. 特異的バインディングリガンドをリガンドに特異的なレセプターと複合せしめて特異的バインディング複合体を生成せしめる工程、

B. 特異的バインディング複合体をベルオキシダーゼで標識する工程

C. ベルオキシダーゼ標識複合体を、

2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオン誘導体、酸化体、

低分子量カチオン界面活性剤（その臨界ミセル濃度を越える0.05～0.25%で存在する）又は0.01～2%のカチオンポリマー、並びに4'-ヒドロキシアセトアニリドと接触せしめて化学ルミネセンス信号を生成する工程、そして

D. 得られた信号を検出する工程、を含んで成る特異的バインディングリガンドを検出するための特異的バインディングアッセイ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、生物学的流体中の種々分析物を検出するための分析化学及び診断化学の分野に関する。詳細には、それは化学ルミネセンスアッセイに有用な信号発生性組成物、それを含有する試験キット並

びに該組成物及び試験キットを使用できる分析方法に関する。

【0002】

【従来の技術】発光アッセイ及び測光アッセイは、目的の分析物の存在の結果として光の放出を生じるものである。一般的には光の放出は、それを測定又は検出するのに十分な存続時間を有し、それによって分析物を検出する。化学ルミネセンス信号（chemiluminescent signal）を発生するのに使用される通常の反応系は、過酸化作用についての基質として、2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオン誘導体（本明細書では「DPD」と同一である）、例えば、ルミノールもしくはイソルミノールを利用するものである。DPDが使用されるものを包含する複数の試みが化学ルミネセンスアッセイの感度を改良してきた。例えば、米国特許第4,729,950号明細書は、ある種の芳香族アミン増強剤（enhancer）の使用を記載する。同様にある種の芳香族フェノールが同じ目的で米国特許第4,598,044号明細書に記載されている。

【0003】

- 20 【発明が解決しようとする課題】この技術は幾分成功裏に商業的に使用されてきたが、しかし非常に低い分析物濃度における感度、試薬の保存安定性の増強及び速度論的（kinetic）安定性（すなわち、一定の光を生成している存続時間）に関して更なる改良の必要性が存在する。種々の系で化学ルミネセンスを改良するためにミセルを使用することが、多数の文献に記載されている。ミセルが増強剤と合わさって化学ルミネセンスを更に改良することは明らかであるようであるが、しかし、米国特許第4,598,044号明細書の増強剤（例えば、p-ヨードフェノール）がミセルと共に使用される場合にはこれが正しくないことが認められた。

【0004】

【課題を解決するための手段】前記既知化学ルミネセンス系で注目された課題は、7～9.5のpHを有し、そして

- a) 2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオン誘導体、
- b) 低分子量カチオン界面活性剤（その臨界ミセル濃度を越える0.05～0.25%で存在する）又は0.01～2%のカチオンポリマー、並びに
- c) 4'-ヒドロキシアセトアニリド、を含んで成る化学ルミネセンス信号を提供するための組成物で解決される。

【0005】また本発明は、個別に包装された

- a) 2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオン誘導体、及び1つ以上の以下の試薬、
- b) 低分子量カチオン界面活性剤（その臨界ミセル濃度を越える0.05～0.25%で存在する）又は0.01～2%のカチオンポリマー、
- c) 4'-ヒドロキシアセトアニリド、並びに
- d) ベルオキシダーゼもしくはベルオキシダーゼ標識特異的バインディング種、を含んで成る診断試験キットを

提供する。

【0006】更に本発明は、A. ベルオキシダーゼを、2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオン誘導体、酸化体、低分子量カチオン界面活性剤（その臨界ミセル濃度を越える0.05~0.25%で存在する）又は0.01~2%のカチオンポリマー、並びに4'-ヒドロキシアセトアニリドの存在下で反応せしめて化学ルミネセンス信号を生成する工程、そして

B. 得られた信号を検出する工程、を含んで成るベルオキシダーゼに応じて化学ルミネセンス信号を提供する方法を提供する。

【0007】本発明は、A. 特異的バインディングリガンドをリガンドに特異的なレセプターと複合せしめて特異的バインディング複合体を生成せしめる工程、

B. 特異的バインディング複合体をベルオキシダーゼで標識する工程

C. ベルオキシダーゼ標識複合体を、2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオン誘導体、酸化体、低分子量カチオン界面活性剤（その臨界ミセル濃度を越える0.05~0.25%で存在する）又は0.01~2%のカチオンポリマー、並びに4'-ヒドロキシアセトアニリドと接触せしめて化学ルミネセンス信号を生成する工程、そして

D. 得られた信号を検出する工程、を含んで成る特異的バインディングリガンドを検出するための特異的バインディングアッセイを提供する。

【0008】

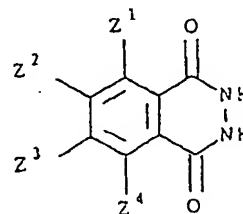
【具体的な態様】本発明は、ベルオキシダーゼ及び2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオン誘導体（本明細書では「DPD」と同定される）の存在に応じて化学ルミネセンス信号を発生するように設計されたいかなる分析方法でも有利に実施できる。そのようなアッセイには、ベルオキシダーゼもしくは過酸化水素以外の非免疫学的分析物の検出のための過酸化水素もしくはベルオキシダーゼ（その遊離状態で）の検出を含む。特に、本発明は、化学ルミネセンス信号を発生する特異的バインディングアッセイの実施に有用である。本発明の改良された水性組成物は、化学ルミネセンス増強剤の不存在下で得られる信号を越えるように信号を増強せしめる化学ルミネセンス増強剤として、4'-ヒドロキシアセトアニリドを含む。

【0009】更に、化学ルミネセンス反応中に励起状態に転換し、次いで光の放出を伴って非励起状態に戻る、いずれかの遊離又は接合2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオン誘導体が本発明の実施に際して有用である。一般的にはこのような化合物は、「ルミノール型ヒドラジド類」として既知であり、それらにはフタル酸ヒドラジド類、ナフタレン-1,2-ジカルボン酸ヒドラジド類、アントラセン-2,3-ジカルボン酸ヒドラジド類、フェナントレンジカルボン酸ヒドラジド類、フルオレン-1,2-ジカルボン酸ヒドラジド類、ベンゾ〔g,h,i〕

ベリレン-1,2-ジカルボン酸ヒドラジド類、コロネン-1,2-ジカルボン酸ヒドラジド類、及び当業者に容易に明らかである別のものが挙げられる。

【0010】詳細には、DPDは構造(II)により規定される。

【化1】



【0011】上式中、 Z^1 、 Z^2 、 Z^3 及び Z^4 は、独立して、水素、炭素原子数1~6のアルキル（例えば、メチル、エチル、イソプロピル、*t*-ブチル、*sec*-ペンチル及びヘキシル）、炭素原子数2~6のアルケニル（例えば、エテニル、1-プロペニル、イソブテニル、2-(*N,N*-ジイソプロピルアミノ)ビニル、2-(*N,N*-ジイソブチルアミノ)ビニル、2-(*N,N*-ジイソペンチルアミノ)ビニル及び2-ヘキセニル)、ヒドロキシ、炭素原子数1~6のアルコキシ（例えば、メトキシ、エトキシ、イソプロポキシ、*t*-ブトキシ及びヘキソキシ）、カルボキシ、アミノ〔アルキルもしくはアルカノイルで置換されたアミノ、例えば、メチルアミノ、エチルアミノ、アミド（例えば、アセトアミド及びヘキサナミド）、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ並びにジイソブチルアミノを包含する）、接合アミノアルケニル（例えば、下記）又はアミノアリール〔置換アミノアリール、例えば、*p*-(*N,N*-ジメチルアミノ)フェニル、*p*-(*N,N*-ジエチルアミノ)フェニル及び5-アミノ-2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオン-8-イル（またルミニルとして既知である）を包含する〕である。

【0012】 Z^1 及び Z^2 の少なくとも1つがアミノ（前記置換アミノを包含する）、接合アミノアルケニル（前記置換アミノアルケニルを包含する）又はアミノアリール〔例えば、*p*-(*N,N*-ジメチルアミノ)フェニル、*p*-(*N,N*-ジエチルアミノ)フェニル及び5-アミノ-2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオン-8-イル〕である。本明細書で用いられる「接合アミノアルケニル」とは、アルケニル基を介してそれが置換されているフタラジンジオンの芳香環にアミノ基から電子共鳴できる一価基を称し、それらには、ジアルキルアミノビニル基〔例えば、2-(*N,N*-ジイソプロピルアミノ)ビニル、2-(*N,N*-ジイソブチルアミノ)ビニル及び2-(*N,N*-ジイソペンチルアミノ)ビニル〕、並びにジアルキルアミノブタジエニル基、例えば、4-(*N,N*-ジエチルアミノ)-1,3-ブタジエン-1-イルが挙げられる。

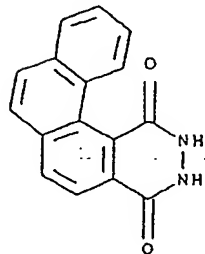
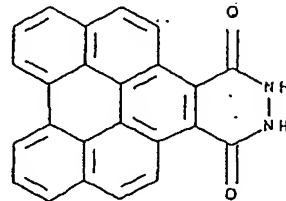
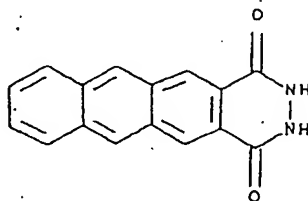
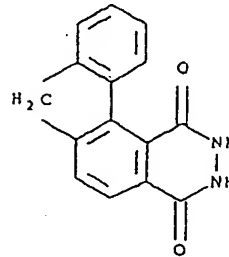
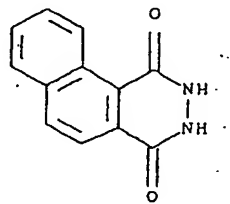
【0013】あるいは、 Z^1 、 Z^2 、 Z^3 及び Z^4 のいずれか隣接する2つ、隣接する3つ又はすべて（すなわち、2つもしくは3つの隣接基の組み合わせであるか、又は4つの基すべて）が、一緒になって1つ以上の芳香環を含有する縮合環系を形成できる。このような縮合環は、1つ以上のヒドロキシ、アミノ（前記のような置換もしくは非置換のもの）又は炭素原子数1～4のアルコキシ（例えば、メトキシ、エトキシ及びイソプロポキシ）で置換できる。好ましくはこのような縮合環は、1つ以上の第1、第2もしくは第3アミン、ヒドロキシ又は前記アルコキシで置換される。

【0014】限定される訳ではないが、代表的な有用なDPD化合物には、ルミノール、イソルミノール、N-（4-アミノブチル）-N-エチルイソルミノール、ヘミスクシンイミド、N-（6-アミノヘキシル）-N-エチルイソルミノール、N-エチルイソルミノール及び7-ジメチルアミノナフタレン-1,2-ジカルボン酸ヒ*

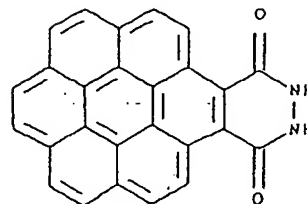
*ドラジドが挙げられる。ルミノール（5-アミノ-2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオン）及びイソルミノール（6-アミノ-2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオン）が好ましく、そしてルミノールが最も好ましい。

【0015】DPD化合物の別の有用なクラスには、置換もしくは非置換のフタル酸ヒドラジド類、4-置換フタルヒドラジド類、アントラセン-2,3-ジカルボン酸ヒドラジド類、フェナントレンジカルボン酸ヒドラジド類、フルオレン-1,2-ジカルボン酸ヒドラジド類、ベンゾ〔q,h,i〕ペリレン-1,2-ジカルボン酸ヒドラジド類及びコロネン-1,2-ジカルボン酸ヒドラジド類、例えば、以下の構造により具体的に示されるものが挙げられる。

【0016】
〔化2〕



及び



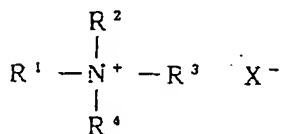
【0017】本発明は、低分子量カチオン界面活性剤を臨界的に使用してミセルを提供するか、又はカチオンポリマーを臨界的に使用して感度、保存安定性及び速度論的安定性の増強された疎水性環境を提供する。一般的には、このような物質は合成されるが、しかし幾つかは天

然物である。カチオン界面活性剤は正味の正電荷を有する。界面活性剤の正電荷は、限定されるものではないが、第4アンモニウム、第4ホスホニウム、スルホニウム、ビリジニウム、ビリミジニウム、イミダゾリウム及びオキソニウムを包含するカチオン基より提供されう

る。

【0018】特に有用なカチオン界面活性剤及びポリマーは、構造(1)により表すことができる。

【化3】



【0019】上式中、 R^1 は、炭素原子数少なくとも7の、そして好ましくは炭素原子数10~20の置換もしくは非置換のアルキル(例えば、 n -オクチル、イソノニル、イソデシル、ドデシル、テトラデシル、ヘキサデシル、オクタデシル、エイコシル、2,7,8-トリメチルデシル、4-エチル-6-メチルドデシル、ベンジル及びフェネチル)、1つ以上の疎水性基、例えば、炭素原子数1~10の直鎖もしくは分枝鎖のアルキル(例えば、メチル、エチル、イソプロピル、 t -ブチルもしくはヘキシル)、ハロ並びに当業者らに既知の別のもので置換されうる芳香核中の炭素原子数6~14の置換もしくは非置換のアリール(例えば、フェニル、ナフチルもしくはアントリル)である。このような置換アリール基には、限定されるものではないが、キシリル、トリル、イソノニルフェニル、ジメチルフェニル及びトリクロロフェニルが挙げられる。また、 R^1 は、炭素原子数8~20の置換もしくは非置換アルケニル(例えば、1-オクテニル、1-デセニル及び2-ドデセニル)又はポリマー部分(下記)であってもよい。

【0020】好ましくは、 R^1 が炭素原子数14~16のアルキルもしくはアルケニルであり、2,4-ジメチル-6-エチルデシル、テトラデシル及びヘキサデシルのような基がより好ましい。構造(1)では、 R^2 は、 R^1 について定義されたアルキルもしくはアルケニル、炭素原子数1~7の置換もしくは非置換のアルキル(例えば、メチル、エチル、イソプロピル、 t -ブチル、メトキシメチル、ベンジル及びヘキシル)、炭素原子数2~7の置換もしくは非置換のアルケニル(例えば、エテニル、アリル、イソプロベニル及び n -ブテニル)、又は環系中の炭素原子数6~10の炭素環式アリール(例えば、フェニル、トリル、キシリル、ナフチル及び p -メトキシフェニル)であることができる。 R^2 、 R^3 及び R^4 の1つは、 R^1 について先に定義された非重合基の1つであることができる。

【0021】 R^2 及び R^4 は、独立して、炭素原子数1~7の置換もしくは非置換のアルキル(例えば、メチル、エチル、イソプロピル、 t -ブチル、メトキシメチル、ベンジル及びヘキシル)、炭素原子数2~7の置換もしくは非置換のアルケニル(例えば、エテニル、イソプロベニル及びアリル)、又は環系中の炭素原子数6~10の炭素環式アリール(例えば、フェニル、トリル、キ

シリル、ナフチル及び p -メトキシフェニル)であることができる。

【0022】あるいは、 R^2 、 R^3 及び R^4 のいずれか2つもしくは3つは、第4アンモニウム原子と共に、一緒になって5~16員の複素環式カチオン基を完成するのに十分な炭素原子及び酸素原子、窒素原子もしくは硫黄原子を表すことができる。このような基の具体例には、限定されるものではないが、ビリジニウム、ピペリジニウム、ピロリジニウム、モルホリニウム、キノリニウム、ピリミジニウム、アクリジニウム、ベンゾチアゾリウム、ベンズオキサゾリニウム及びイミダゾリウムが挙げられる。好ましくは、 R^2 、 R^3 及び R^4 が独立してメチルもしくはエチルである。

【0023】 X^- は、ベルオキシダーゼについての基質もしくは阻害剤ではない適当な一価の酸アニオンであり、それらには、限定されるものではないが、過塩素酸イオン、ハロゲン化物イオン(例えば、フッ化物イオン、塩化物イオン及び臭化物イオン)、テトラフルオロホウ酸イオン、トリフラート、メチル硫酸イオン、ヘキサフルオロリン酸イオン、硝酸イオン及び p -トルエンスルホン酸イオン並びに当業者に容易に明らかである別のものが挙げられる。ハロゲン化物アニオンが好ましい。

【0024】有用な非重合カチオン界面活性剤の具体例は、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムクロリド、ドデシルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルトリメチルアンモニウムブロミド(またヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミドとして既知である)、ココトリメチルアンモニウムクロリド、タロウトリメチルアンモニウムクロリド、ソヤトリメチルアンモニウムクロリド、ミリスチルトリメチルアンモニウムブロミド、ステアリルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルエチルジメチルアンモニウムブロミド、ジドデシルジメチルアンモニウムブロミド、セチルビリジニウムクロリド及びミリスチルジメチルベンジルアンモニウムクロリドである。セチルトリメチルアンモニウムブロミドが最も好ましい。

【0025】構造(1)中の R^1 がポリマー部分であるようなポリマーの主鎖は、従来のポリエステル類、ポリアミド類、ポリエチレンイミン類、ポリカーボネート類、セルロース材料類、及び所望の正電荷を有するモノマーの繰り返し単位から成るビニル付加ホモ及びコポリマー類でありうる。これらの物質は、従来の方法を用いて従来の材料から製造できる。ポリマーは、出発材料由来の又は製造後の化学反応由来の電荷をその中に取り入れて担持できる。

【0026】特に有用なカチオンポリマーは、必要な正に荷電した基を有するエチレン系不飽和重合性モノマー、並びに界面活性剤に特有な疎水性領域、架橋領域もしくは別の適当な性質を提供する1つ以上のコモノマー

より製造されるビニル付加ホモもしくはコポリマーである。

〔0027〕代表的なカチオンモノマーには、限定されるものではないが、N-シクロヘキシル-N,N-ジメチル-N-(m&p-ビニルベンジル)アンモニウムクロリド、N-ベンジル-N,N-ジメチル-N-(m&p-ビニルベンジル)アンモニウムクロリド、3-(2-ヒドロキシプロピル)-1-ビニルイミダゾリウムクロリド及び1-メチル-4-ビニルピリジニウムクロリドが挙げられる。有用なモノマーには、限定されるものではないが、スチレン及びその誘導体類(例えば、ビニルトルエン及びp-メチルスチレン)、アクリル酸及びメタクリル酸エステル類(例えば、メチルアクリレート、メチルメタクリレート、ブチルアクリレート及びブチルメタクリレート)、架橋可能なモノマー類(例えば、ジビニルベンゼン、エチレンジアクリレート、エチレンジメタクリレート及びN,N'-メチレンビス(アクリルアミド))が挙げられる。別の有用なポリマーが、例えば、米国特許第4,069,017号及び同第4,024,839号明細書に媒染剤(mordant)として記載されている。一般的にはこのような材料は、ポリマー主鎖からのペンダントである第4アンモニウム基もしくは第4ホスホニウム基を有し、そして好ましくは、このような基を有する繰り返し単位を誘導する少なくとも40~100重量%のエチレン系不飽和重合性モノマーを有する。残りの繰り返し単位は、前記特許に記載される多種多様なエチレン系不飽和重合性モノマーより誘導できる。

〔0028〕代表的なカチオンポリマーには、限定されるものではないが、ポリ(N,N,N-トリメチル-N-ビニルベンジルアンモニウムクロリド)、ポリ[スチレン- α -ベンジル-N,N-ジメチル-N-(m&p-ビニルベンジル)アンモニウムクロリド- α -ジビニルベンゼン]、ポリ(N,N,N-トリオクチル-N-ビニルベンジルホスホニウムクロリド)、ポリ[スチレン- α -N-ビニルベンジル-N,N,N-トリヘキシルアンモニウムクロリド]、ポリ[スチレン- α -N,N,N-トリメチル-N-ビニルベンジルアンモニウムクロリド]、ポリ[N-シクロヘキシル-N,N-ジメチル-N-(m&p-ビニルベンジル)アンモニウムクロリド]、ポリ[スチレン- α -1-ビニルイミダゾール- α -3-(2-ヒドロキシエチル)-1-ビニルイミダゾリウムクロリド]及び当業者に容易に明らかである別のものが挙げられる。好ましいカチオンポリマーは、ポリ[N-シクロヘキシル-N,N-ジメチル-N-(m&p-ビニルベンジル)アンモニウムクロリド]である。

〔0029〕一般的には、本発明の組成物は、当該技術分野で周知である1つ以上の適当な緩衝剤を用いてpH7~9.5に緩衝化される。どのくらいのいずれかの緩衝剤が所望のpHを維持するのに必要であるのかは周知であるので、緩衝剤の量は当業者に容易に明らかであろう。一

般的にはDPDの量は、少なくとも0.01ミリモルであり、0.1~10ミリモルの範囲内の量が好ましい。4'-ヒドロキシアセトアニリドは、一般的には少なくとも0.01ミリモルの量で存在し、0.05~5ミリモルの範囲内の量が好ましい。

〔0030〕非重合カチオン界面活性剤は、その臨界ミセル濃度を越える0.05~0.25%の量で存在する。カチオンポリマーが組成物に含まれる場合には、それは0.01~2(重量)%の量で存在する。前記安定化水性組成物を除いて、また本発明は、個別に包装された試薬、装置及び種々分析方法(下記)を実施するのに有用な使用説明書のキットを提供する。キット要素の包装方法は当該技術分野で周知である。

〔0031〕ある態様では、キットは、個別に包装された、前記DPD、及び1つ以上の前記カチオン界面活性剤もしくはカチオンポリマー、4'-ヒドロキシアセトアニリド及びベルオキシダーゼもしくはベルオキシダーゼ標識特異的バインディング種を含んで成る。好ましくはキットが、DPDを除く1成分として4'-ヒドロキシアセトアニリドを含有する。「特異的バインディング種」とは、レセプターと特異的に結合し、そのため別の物質とは結合しないいずれかの生物学的もしくは化学的化合物を意味する。有用な特異的バインディング種には、限定されるものではないが、抗体類、非免疫反応性タンパク質類(例えば、アビジン及び数種の酵素類)、抗原類、ハプテン類、ビタミン類(例えば、ビオチン)、レクチン類、糖類、ペプチド類、ポリペプチド類、オリゴヌクレオチド類、核酸類及び細胞表面バインディング種が挙げられる。特に有用な標識特異的バインディング種はベルオキシダーゼ標識タンパク質類もしくはオリゴヌクレオチド類である。このようなタンパク質は抗体類及びアビジンを包含する。所定の特異的バインディング種に適するレセプターは周知である。アッセイに有用な別の成分(例えば、下記酸化体)は、試験キットに含めることができる。

〔0032〕本発明は、分析物に応じて化学ルミネッセンス信号を生成することが望ましい、所定の分析物を検出するためのいずれかの方法に使用できる。多くの場合には、分析物であるかもしれないベルオキシダーゼの存在に応じて信号が発生する。あるいは、ベルオキシダーゼを、別の分析物の存在の結果として反応に役立たせることができる。DPD、4'-ヒドロキシアセトアニリド及び酸化体の存在下、ベルオキシダーゼは、適当な装置を用いて測定できる光の放出を生ぜしめることができる。

〔0033〕ベルオキシダーゼ及び4'-ヒドロキシアセトアニリドの存在下で光が放出されるので、酸化体はDPDの励起を引き起こすのに必要とされる。各種の有用な酸化体が既知であるが、しかし過酸化水素及び過酸化水素が好ましく、後者が最も好ましい。本発明の

幾つかの方法は、ヘルオキシダーゼが「遊離状態」（非接合型）で臨床分析に使用される。特異的バインディング方法では、しかしながら、ヘルオキシダーゼが特異的バインディングリガンドもしくはそれらのレセプターと、又はリガンドもしくはレセプターのどちらかと反応性である特異的バインディング分子との接合体として使用される。リガンド及びレセプターは、このようなアクセシで複合せしめられるので、それらは複合体もしくは未複合物質の最終検出のためにヘルオキシダーゼで標識される。

【0034】多様な特異的バインディングアクセシフォーマットが本発明の実施に際して有用であり、それらには、核酸ハイブリダイゼーションアクセシ類、免疫化学的アクセシ（例えば、エンザイムイムノアクセシ類、サンドウィッチアクセシ類、競合バインディングアクセシ類、直接バインディングアクセシ類）及び当該技術分野で周知の別のものが挙げられる。従って、本発明方法は、いずれかの多種多様な化学的及び生物学的材料、例えば、アミノ酸類、ペプチド類、ポリペプチド類、タンパク質類（酵素類、アビジン、抗体類及び抗原タンパク質類を包含する）、炭水化物（単糖類、多糖類及びリボ多糖類を包含する）ホルモン類（例えば、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、甲状腺刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、サイロキシン、卵胞刺激ホルモン、上皮小体ホルモン及び成長ホルモン）、代謝産物（例えば、グルコース、ラクテート及びビルベート）オリゴヌクレオチド類、核酸類、ビタミン類（例えば、 B_{12} 及びビオチン）、種々生物（微生物を包含する）由来の未処理細胞並びに薬剤（麻酔薬、治療薬及び誤用されたもの）を検出するのに使用できる。

【0035】目的のリガンドが少なくとも第1及び第2レセプターと同時にあるいは所望の順序で複合せしめられるので、本発明の特に有用な特異的バインディング方法は、サンドウィッチアクセシとして当該技術分野で既知であるものである。レセプターの1つは、吸着、共有結合又は別の既知付着方法により適当な支持体（例えば、マイクロタイタープレート、ポリマー磁気粒子又はガラス粒子、フィルム、膜、フィルターペーパー並びに当該技術分野で既知である別のもの）の上に不溶化されるか、又は更なる複合もしくは反応を介して不溶化せしめることができる。例えば、レセプターは、支持体上に不溶化されている、特異的バインディング部分に対応するレセプター部分（例えば、アビジン）と反応性である特異的バインディング部分（例えば、ビオチン）で標識できる。

【0036】サンドウィッチアクセシでは、目的のリガンドについての第2レセプターは、ヘルオキシダーゼで標識できるか、又は更なる特異的バインディング反応を介して標識せしめることができる。標識の検出は前記試薬を用いて達成される。より好ましい態様では、目的の

リガンドが、抗体と反応性である抗原物質であるか、又は相補的核酸（例えば、オリゴヌクレオチド）とハイブリダイゼーションできる核酸である。

【0037】前記アクセシは、溶液もしくは乾式フォーマットで実施できる。一般的には溶液アクセシとは適当な容器中で溶液状態で実施される方法を称し、そして不均一な特異的バインディングアクセシの場合には、次いで適当な分離技術及び装置を使用して結合していない材料が結合材料から分離される。乾式アクセシでは、化学的もしくは特異的バインディング反応が乾式要素、試験ストリップもしくは繊維状シート中で実施でき、そして本発明の安定化化学ルミネッセンス組成物を添加せしめることにより分析物の存在が検出される。

【0038】

【実施例】以下の例は、本発明の実施を更に具体的に説明するものであるが、限定しようとするものではない。すべてのパーセンテージが、特に断らない限り重量パーセントである。

【0039】例1 カチオン界面活性剤の使用を異なる増強剤と比較するヘルオキシダーゼについての溶液アクセシ

増強剤として4'-ヒドロキシアセトアニリドを含有する本発明の水溶性化学ルミネッセンス組成物を用いてヘルオキシダーゼについての溶液アクセシを実施し、そしてそれを、増強剤として4-ヨードフェノールを含有する同様の組成物を用いたものと比較した。

【0040】以下のものを1.5mLポリプロピレンチューブの中で混合せしめて、本発明の安定化組成物（総容量300 μ L）を生成した：西洋ワサビヘルオキシダーゼ（24.3ピコモル、Sigma Chemical XIIグレード）、ルミノール（1ミリモル）、セチルトリメチルアンモニウムブロミド カチオン界面活性剤（0.1重量/容量%）、4'-ヒドロキシアセトアニリド（0.333ミリモル）及びトリリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩酸塩緩衝剤（0.1モル、pH8）。

【0041】カチオン界面活性剤を用いずに同様の組成物（増強剤、対照A、0.333ミリモル）を調整し、そして分離チューブに入れた。対照Bは、4-ヨードフェノール（0.444ミリモル）を入れたがカチオン界面活性剤を入れずに調整し、そしてチューブに入れた。対照Cは、4-ヨードフェノール（0.333ミリモル）及びカチオン界面活性剤（0.1重量/容量%）を入れて調整し、そしてチューブに入れた。対照Dは、増強剤及びカチオン界面活性剤を入れずに調整し、そして対照Eは界面活性剤（0.1重量/容量%）を入れたが増強剤を入れずに調整した。

【0042】過酸化水素を各チューブに添加し（2ミリモル）そして渦状に混合せしめた後、4.5分後に伝統的なTurner luminometer（10秒間積分（integral）光単位）及び標準方法を用いて各チューブの化学ルミネセン

ス光信号を測定した。結果を下記第 I 表に示す。
〔0043〕

*〔表 1〕

*

第 I 表

アッセイ	化学ルミネセンス信号 (光単位)
例 1	14.9
対照 A	15.1
対照 B	232.1
対照 C	0.16
対照 D	0.02
対照 E	0.17

〔0044〕データは、増強剤として 4'-ヒドロキシアセトアニリドを使用した場合 (対照 A 及び本発明) には、カチオン界面活性剤の存在が信号に悪影響を及ぼさないことを示している。しかしながら、増強剤として 4-ヨードフェノールを使用した場合には、カチオン界面活性剤の存在により信号がかなり低減された (対照 B 対照 C)。対照 D 及び E は、カチオン界面活性剤を含む場合と含まない場合の組成物のバックグラウンド信号を示す。個別に認められるように、例 1 は、光信号の持続時間がより長いので、対照 A を越える改良であるとみなされるが、しかし定着時間測定よりもむしろ連続的な同様の試験を行った。

〔0045〕例 2~7 種々カチオン物質の比較使用
これらの例では、数種の異なるカチオン界面活性剤及びカチオンポリマーを、増強剤として 4'-ヒドロキシアセトアニリドを用いた場合の化学ルミネセンス信号におけるそれらの影響について評価した。様々な量 (第 II 表参照) の西洋ワサビペルオキシダーゼについてのアッセイを実施した。対照 F~K を、増強剤として 4-ヨードフェノールを用いて同様に実施した。対照 L 及び M を、それぞれ増強剤として 4'-ヒドロキシアセトアニリド及び 4-ヨードフェノールを用いたが、カチオン界面活性剤もしくはポリマーの不存在下で実施した。

〔0046〕マイクロタイタープレートの試験ウェルに、西洋ワサビペルオキシダーゼ (様々な量)、ルミノール (1 ミリモル)、過酸化水素 (2 ミリモル、最後に添加)、カチオン物質 (様々な量)、ジエチレントリアミン五酢酸 (0.1 モル)、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン塩酸塩 (0.05 モル, pH 8) 及び増強剤 (0.15 ミリモル) を含有する組成物 (総容量 200 μ L) を添

加した。各試験ウェルに過酸化水素を添加してから 5 分後に、化学ルミネセンス信号を 10 秒間隔で伝統的なラボシステム (Lab. Systems) Luminoskan (商標) マイクロプレート・リーダーを用いて測定した。カチオン物質及び各試験に使用した量は下記の通りであり、そして第 II 表は 3 つの別個の実験の平均値として得られたデータを示す。

〔0047〕例 2: セチルトリメチルアンモニウムブロミド (0.1%)、

例 3: ポリ〔N-シクロヘキシル-N,N-ジメチル-N-(m&p-ビニルベンジル)アンモニウムクロリド〕 (0.25%)、

例 4: ポリ〔スチレン-コ-N-ベンジル-N,N-ジメチル-N-(m&p-ビニルベンジル)アンモニウムクロリド-コ-ジビニルベンゼン〕 (モル比 4.95:4.95:0.1) (0.05%)、

例 5: ポリ〔スチレン-コ-1-ビニルイミダゾール-コ-3-(2-ヒドロキシエチル)-1-ビニルイミダゾリウムクロリド〕 (モル比 5:4:1) (0.025%)、

例 6: ポリ〔N-シクロヘキシル-N,N-ジメチル-N-(m&p-ビニルベンジル)アンモニウムクロリド〕 (0.25%)、及び

例 7: ポリ〔スチレン-コ-1-ビニルイミダゾール-コ-3-(2-ヒドロキシエチル)-1-ビニルイミダゾリウムクロリド〕 (モル比 4.4:2:3.6) (0.1%)。

〔0048〕

〔表 2〕

第II表
化学ルミネセンス信号 (光単位)

ペルオキシ ダーゼの量 (ピコモル)	対照 L	例 2	(S/N)*	例 3	(S/N)	例 4	(S/N)	例 5	(S/N)	例 6	(S/N)	例 7	(S/N)
0	0.00	0.3		0.10		0.05		0.10		0.14		0.04	
0.25	0.14	0.42	14	0.29	2.9	0.18	3.6	0.25	2.5	0.34	2.4	0.22	5.5
2.5	1.88	6.19		3.17		2.22		2.08		3.96		2.87	
25	13.19	53.89		28.30		14.32		16.51		38.47		26.17	
250	80.84	321		201.33		173.33		100.19		360.00		200.61	

ペルオキシ ダーゼの量 (ピコモル)	対照 M	対照 F	(S/N)	対照 G	(S/N)	対照 H	(S/N)	対照 I	(S/N)	対照 J	(S/N)	対照 K	(S/N)
0.0	0.00	0.07		0.10		0.05		0.10		0.16		0.08	
0.25	0.03	0.09	1.28	0.08	0.8	0.06	1.2	0.11	1.1	0.20	1.2	0.07	0.88
2.5	2.19	0.24		2.53		0.57		1.86		0.76		0.63	
25	52.89	6.56		59.21		18.44		41.74		28.22		33.09	
250	805.67	146.00		883.00		416.00		726.33		727.00		719.67	

S/N=信号対ノイズの比 (ペルオキシダーゼ0ピコモルにおけるノイズ)

【0049】これらのデータは、増強剤として4'-ヒドロキシアセトアニリドを用いた場合には、すべてのカチオン物質がすべての酵素レベルで化学ルミネセンス信号を増強したことを示す。この効果は、更に0.25ピコモルの西洋ワサビペルオキシダーゼを用いて実施されたこれらのアッセイについて約2を越えるノイズ比に対する信号によって証明される。増強剤として4-ヨードフェノールを用いた場合には、その濃度におけるS/N比は、約1.3以下であり、従って、対照Mを上回る明らかな信号増大はブランク増大のみによるものであったこと

を示している。4-ヨードフェノールを用いた別のレベルの酵素濃度では、カチオン物質は信号の減少を引き起こしたか、又は何の効果も生じなかった。

【0050】例8 非イオン及びアニオン界面活性剤との比較

本例は、カチオン界面活性剤の存在は化学ルミネセンス組成物を安定化せしめるが、しかし非イオン及びアニオン界面活性剤は同様の結果を達成しないことを具体的に示すものである。

【0051】使用した組成物は、前記例2～7に示した

ものと類似のものであった。対照N及びN'は全く界面活性剤を含有しないものであった。例8及び対照O〜Tは、増強剤として4'-ヒドロキシアセトアニリドを用いて実施した。対照S〜Wは、増強剤として4-ヨードフェノールを用いて実施した。以下の界面活性剤を使用した(各々0.1%):

例8及び対照S:セチルトリメチルアンモニウムブロミド、

対照O及びT:TRITON(商標)X-100 オクチルフェノキシポリエトキシエタノール非イオン界面活性剤(Rohm and Haas)、

対照P及びU:BRJ(商標)35 ポリオキシエチレンラ*

*ウリルエーテル非イオン界面活性剤(Honeywell-Atlas Ltd.)、

対照Q及びV:TWEEN(商標)20 ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート非イオン界面活性剤(ICI Americas, Inc.)、及び

対照R及びW:ドデシル硫酸ナトリウム アニオン界面活性剤。

化学ルミネセンスアッセイを、様々な西洋ワサビベルオキシダーゼ濃度で例2〜7に記載したように実施した。

結果を下記第III表に示す。

[0052]

[表3]

第III表
化学ルミネセンス信号(光単位)

ベルオキシダーゼの量 (ピコモル)	対照 N	例 8	対照 O	対照 P	対照 Q	対照 R
0	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
0.25	0.10	0.24	0.06	0.07	0.08	0.09
2.5	1.72	4.12	1.23	1.21	1.28	1.40
25	14.26	33.84	9.25	8.79	9.08	10.46
250	99.61	232.67	59.31	57.18	56.46	67.71

ベルオキシダーゼの量 (ピコモル)	対照 N'	例 S	対照 T	対照 U	対照 V	対照 W
0	0.00	0.06	0.00	0.00	0.01	0.00
0.25	0.01	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00
2.5	0.84	0.17	0.21	0.50	0.60	0.58
25	30.69	3.71	11.81	18.39	18.29	20.48
250	773.33	93.29	291.67	376.33	319.67	491.33

[0053]これらのデータは、4'-ヒドロキシアセトアニリドの存在下ではカチオン界面活性剤のみが化学ルミネセンス信号を増強することを示す(例8)。信号は、両増強剤の存在下では非イオン及びアニオン界面活性剤で低減される。

[0054]例9 甲状腺刺激ホルモンについての溶液アッセイ

本例は、溶液中の甲状腺刺激ホルモン(TSH)の検出についての本発明の実施を具体的に説明し、そしてそれを本発明の範囲外のアッセイと比較するものである。本発明は、下記のことを除いて、同様の装置及び試薬を使用して、市販のAMERLITE(商標)TSHアッセイと同様に実施した。TSHキャリブレーター溶液を試験被検体として使用した。

[0055]使用した化学ルミネセンス信号発生性組成物は、以下の通りである。

対照X:ホウ酸緩衝剤(0.1モル, pH 8.5)中にルミノール(0.125ミリモル)、4-ヨードフェノール(0.1

ミリモル)、過ホウ酸塩(1ミリモル)、ベンゾエート(0.56ミリモル)及びクエン酸塩(3.5ミリモル)を含有せしめた。

対照Y:対照X及び更にセチルトリメチルアンモニウムブロミド(0.1%)を含有せしめた。

例9:4'-ヒドロキシアセトアニリド(0.15ミリモル)、ルミノール(1ミリモル)、過酸化水素(2ミリモル)、ジエチレントリアミン五酢酸(0.1ミリモル)、セチルトリメチルアンモニウムブロミド(0.1%)及びトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、塩酸塩(0.05モル, pH 8)。

対照Z:4'-ヒドロキシアセトアニリドの代わりに4-ヨードフェノール(0.15ミリモル)を使用したことを除いて例9と同様であった。

[0056]次いでAMERLITE(商標)TSHアッセイプロトコールを、抗TSHモノクローナル抗体を試験ウェルの壁面上に吸着せしめた市販のマイクロタイタープレートを用いて行った。一般的にはこのプロトコールは

下記段階を包含する。

a) 静菌剤を含有するアッセイ試薬 (100 μ L) を試験ウェルに添加する段階。

b) 試験被検体 (100 μ L) を試験ウェルに添加する段階。

c) 37°Cで30分間 AMERLITE (商標) 振盪機インキュベーターでプレートインキュベーションする段階。

d) 流体を吸引し、そしてすべての試験ウェルを AMERLITE (商標) 洗浄器で洗浄する段階。

e) 抗TSH西洋ワサビペルオキシダーゼモノクローナル抗体接合体 (200 μ L) を試験ウェルに添加し、そして振盪させながら37°Cで約30分間インキュベーションする段階。

f) 流体を吸引し、そしてすべての試験ウェルを洗浄する段階。

g) 信号発生性試薬を各試験ウェルに添加する段階。

h) 5分以内に、例2~7に記載されたように生成した、化学ルミネセンス信号を (光単位で) 測定する段階。

これらのアッセイの結果を (2つの試験の平均として) 下記第IV表に提供する。

【0057】

【表4】

20

30

第IV表
化学ルミネセンス信号

TSHの量 (μ I.U./mL)	対照 X	(S/N)*	対照 Y	(S/N)	例 9	(S/N)	対照 Z	(S/N)
---------------------------	---------	--------	---------	-------	--------	-------	---------	-------

0	6.32	1.78	32.36	1.18	5.08	6.16	7.37	1.17
0.22	11.22	48	38.18	1.25	31.31	36	8.61	5.8
1.00	303.11	471	40.56	5.9	182.82	249	43.12	115.6
4.91	2975.32	3711	190.98	106	1267.49	1520	851.85	1178
42.3	23455.17	12120	3422.84	455	7723.45	3521	8685.62	3807
196	76598.69		14711.93		17887.63		28061.77	

S/N = 前記のような信号対ノイズの比。

【0058】データは、対照Y及びZのように4-ヨードフェノールと共にカチオン界面活性剤を使用すると化学ルミネセンス信号及び信号/ノイズ (S/N) 比を低減することを示す。本発明は、カチオン界面活性剤を4-ヒドロキシアセトアニリドと共に使用したので、低濃度のTSH分析物で (例えば、0.22 μ I.U./mL) 改良された感度を提供した。甲状腺機能正常 (正常) 体質と甲状腺機能亢進症を区別するために可能な限り低い濃度でTSHを検出することが極めて望ましい。2を越えるS/N比は受入れられる。

【0059】例10 乾式分析要素で実施したアッセイ本例は、乾式分析要素を用いる分析物、西洋ワサビペルオキシダーゼの検出についての本発明の実施を具体的に説明するものである。要素は以下の構造及び成分を有し

50

た。

*【表5】

【0060】

*

乾燥付着量
(g/m²)

展開層	ポリ(ビニルトルエン-コ-メタクリル酸) (重量比 98:2)の粒子(30μm)	130
	ポリ(メチルアクリレート-コ-ナトリウム 2-アクリルアミド-2-メチルプロパン- スルホネート-コ-2-アセトアセトキシ- エチルメタクリレート) (モル比 90:4:6)	2.583
	トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝剤 (pH8)	1.21
	ジエチレントリアミン五酢酸	0.0039
	ZONYL(商標)FSN非イオン界面活性剤	0.054
	塗布前にHClでpHを8に調整した	
試薬層	硬化ゼラチン	10.15
	トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝剤 (pH8)	1.21
	ジエチレントリアミン五酢酸	0.004
	TRITON(商標)X-100非イオン界面活性剤 総量の	0.02%
	塗布前にHClでpHを8に調整した	
下塗り層	ポリ(メチルアクリレート-コ-塩化ビニリデン- コ-イタコン酸)	

ポリ(エチレンテレフタレート)支持体

【0061】化学ルミネセンス信号発生性組成物を以下の試薬を用いて調整した。ルミノール(1ミリモル)、
過酸化水素(2ミリモル)、ジエチレントリアミン五酢酸(0.1ミリモル)、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、塩酸塩(0.05モル, pH8)、セチルトリメチルアンモニウムブロミド(0.1%)、4'-ヒドロキシアセトアニリド(0.15ミリモル, 例10)又は4-ヨードフェノール(0.4ミリモル, 対照AA)、並びに西洋ワサビペルオキシダーゼ(第V表中の量)。

【0062】対照BBを、カチオン界面活性剤を省いたが4-ヨードフェノールを用いて同様に調整し、そして対照CCを、カチオン界面活性剤を省いたが4'-ヒドロキシアセトアニリドを用いて同様に調整した。ペルオキシダーゼを組成物に添加して渦状に混合せしめた後、各試料(10μL)を個々の要素の展開層(表面領域 16m²)に塗布した。5分後、要素中の試薬により発生して得られた化学ルミネセンス信号を、市販のTurner ルミノメーターにおける37°Cで放出された光の10秒間の積分を用いて測定した。下記第V表に提供された結果は、各組成物について2つの試験の平均である。

【0063】

【表6】

第V表
化学ルミネセンス信号 (光単位)

ペルオキシ ダーゼの量 (ピコモル)	例 10	(S/N)	対照 AA	(S/N)	対照 BB	(S/N)	対照 CC	(S/N)
0	0.77		1.14		1.50		1.07	1.06
1	0.78	1.01	1.15	1.01	1.55	1.03	1.13	1.07
5	0.85	1.10	1.16	1.02	1.48	0.99	1.15	
10	0.99	1.28	1.23	1.08	1.50	1.00	1.25	1.17
50	18.39	23.9	1.33	1.17	1.60	1.06	8.54	7.98
100	80.19	104.1	1.51	1.33	1.72	1.15	54.5	50.91
500	709.1	920.3	4.32	3.80	5.74	3.82	712.5	665.6
1000	1179.0	1530	349.35	307.2	613.7	408.6	931.1	869.7

(13)

特開平6-197796

24

【0064】データは、組成物にカチオン界面活性剤を添加すると、より低い分析物濃度（例えば、50ピコモル）で化学ルミネセンス信号及び信号／ノイズ（S／N）比を増強したことを示す。4-ヨードフェノールを含有する組成物にカチオン界面活性剤を添加すると、ほとんどの分析物濃度で信号を実際に低減した。分析要素を製造するために使用される塗膜処方中の塗布助剤としての非常に少量の非イオン界面活性剤 ZONYL（商標）F SN及び TRITON（商標）X-100 の存在は、アッセイ中の化学ルミネセンス信号の発生に悪影響を及ぼさない。

10

【0065】

【発明の効果】本発明は、分析的、免疫化学的及びハイブリダイゼーションアッセイにおける化学ルミネセンス検出の使用に伴うすべての既知利点を提供する。しかしながら、更なる予測しなかった利点、すなわち、より良好な速度論的安定性、低い分析物濃度における高感度及びより直線的な較正曲線が達成された。「速度論的安定性」とは、一定の光出力の存続時間の増大を意味する。これらの結果は、低分子量カチオン界面活性剤もしくはカチオン親水性ポリマーより生成されるカチオンミセルに化学ルミネセンス増強剤として4'-ヒドロキシアセトアニリドを使用することによって達成される。別の既知増強剤は、カチオンミセルの存在下でさえ、このような利点を提供しなかった。

20

30